热带假丝酵母高效利用甘油研究

彭健[1]，苏静[1]，杨晓慧[1]，王腾飞[1]，汪俊卿[1]，王瑞明[1]

1 齐鲁工业大学山东省微生物工程重点实验室，生物工程学院，山东济南 250353

摘要：目的：热带假丝酵母以油脂为底物发酵时会产生副产物甘油，本研究对热带假丝酵母 *gk* 基因进行过表达，将副产物甘油转化为能量，提高油脂转化利用效率。方法：本研究以热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 1798 中的甘油激酶（*gk*）为研究对象，利用 PCR 技术获得同源臂基因 *gkpR*，通过一步法无缝克隆将同源臂和 G418 抗性基因(*kan*ʳ)连接至 pPICzαA 载体，同时将解脂假丝酵母 *Candida lipolytica* 1457 中的启动子基因 *pGAP* 无缝连接至载体中的 *gkpR*，构成质粒 *pPICzαA-gkp*，并电转化至 *C.tropicalis* 1798 感受态细胞中，通过一次同源单交换，将启动子 *pGK* 替换为 *pGAP*。结果：经过 G418 抗性筛选和 PCR 鉴定，成功获得 *pGAP* 基因替换菌株 *C. tropicalis* 1798-*gkPr*；发酵验证结果显示，启动子基因替换 *C. tropicalis* 1798 在以甘油为底物培养时重组菌 OD_{600} 值比野生型菌株高 46.4%，重组菌培养基中甘油剩余量比野生菌降低 56.1%，表明启动子替换能促进 *C. tropicalis* 1798 对甘油吸收利用。此外，以油脂为底物进行发酵实验时还发现重组菌产长链二元酸的量比野生菌提高 32.7%。结论：通过启动子替换手段构建的重组菌 *C. tropicalis* 1798-*gkPr*，提高了热带假丝酵母对于油脂组分中甘油成分的利用效率。

关键词：*gk* 基因，热带假丝酵母，一步法无缝克隆，*pGAP* 基因

Studies on efficient utilization of glycerol of *Candida tropicalis* 1798

PENG jian, SU jing, YANG Xiao-hui, WANG Teng-fei, WANG, Jun-qing, WANG Rui-ming

QiLu University Of Technology , Biological Engineering, JiNan ShanDong Province 250353

Abstract: *Candida tropicalis*1798 will produces glycerol when fermented grease. *C.tropicalis*1798 efficient use of glycerol and it will provides energy for fermentation and improve the utilization of grease by genetically modified. In this study, a related glycerol metabolism gene *gk* in *C. tropicalis* 1798 was intended to replace the promoter gene.about 500 bp DNA fragment *gkpR* in gk gene was cloned by using PCR, *gkpR* and a G418 resistance gene (*kan*ʳ) was connected to vector of pPICzαA by One Step Cloning Kit,the promoter gene of pGAP from *C. lipolytica* 1457 will be connected to the *gkpR* in recombinant vector by One Step Cloning Kit. The recombinant plasmid *pPICzαA-gkp* was transformed into *C. tropicalis* 1798 competent cells.Through a single homologous exchange, replace the promoter *pGK* with *pGAP*. After G418 resistance experiments,PCR determination, we obtained *pGAP* promoter replacement *C. tropicalis* 1798-*gkPr* successfully;The verification results offer mentation shows, The analysis was founded

Received:June 16, 2012; Accepted:
Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31501413); Shandong Province independent innovation and achievement transformation project (No. 201422CX02602); Taishan Scholar Construction Project
Corresponding author: WANG Jun-qing. Tel: +86-0531-8963-1138; E-mail: wjqtt.6082@163.com;.
国家自然科学基金(No. 31501413)，山东省自主创新及成果转化专项 (No. 201422CX02602)，泰山学者建设工程专项经费资助。

that the OD_{600} of *C. tropicalis* 1798-*gkPr* was 46.4% higher than that of *C. tropicalis* 1798 and the glycerol content of *C. tropicalis* 1798-*gkPr* was accounted for just 56.1% when it was cultured for 12 hours with glycerin as substrate. it revealed that replace the promoter pGAP gene affected utilization of glycerol in *C. tropicalis* 1798-*gkPr*. The another analysis was also founded that the long-chain dicarboxylic acid production of *C. tropicalis* 1798-*gkPr* was 32.7% higher than that of *C. tropicalis* 1798 when it was cultured for 6 days with oil as substrate. Conclusion: A *C. tropicalis* 1798 strain with replace the promote gene was successfully constructed by means of gene replace,and increased the utilization of *C. tropicalis* 1798 for glycerol constituents in the grease component.

Keywords: *gk* gene, *Candida tropicalis*1798, One Step Cloning Kit, *pGAP* gene

热带假丝酵母（*Candida tropicalis*）即热带念珠菌，是常见的假丝酵母，是一种双相型单细胞酵母菌，广泛存在于自然界。*C. tropicalis* 是重要的工业酵母，除了作为工业化生产长链二元酸、木糖醇等化工原料的主要生产菌之外，也是食品造纸等工业废水的处理利用废弃物生产单细胞蛋白的重要微生物[1-3]。长链二元酸(Long chain dicarboxylic acids)是热带假丝酵母生产的重要化工用产品之一，主要用于高性能尼龙，香料，医药，农药等领域[4]，目前国内生产长链二元酸主要通过微生物发酵烷烃制得[5-6]。本研究前期发现一热带假丝酵母菌株能够转化油脂产生二元酸，但在发酵过程中发现，*C. tropicalis* 1798 以可再生资源油脂为底物发酵生产长链二元酸的同时会积累副产物甘油。在酵母细胞中的代谢过程中[7-8]，甘油激酶 *gk* 是利用甘油的限速酶,它催化甘油磷酸化反应生成 3-磷酸甘油[9]，3-磷酸甘油在 3-磷酸甘油脱氢酶(*mtGPD*)的催化下氧化成磷酸二羟丙酮，进一步返回至糖酵解途径。关于甘油在酵母中的代谢合成途径已有报道[10-12]，但对酵母中甘油利用途径的研究则相对较少。

甘油激酶 *gk* 作为 *C. tropicalis* 1798 中甘油代谢的关键酶，能够促进甘油在酵母细胞中的代谢，该基因在酵母细胞内活性的表达受其启动子 *pGK* 的控制。前期通过大量实验比对发现，解脂假丝酵母(*C. lipolytica* 1457）具有较强的甘油代谢能力，而该通路上的 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子 *pGAP* 则是常用的组成型强启动子。因此本研究以 *C. tropicalis* 1798 中的甘油激酶 *gk* 为研究对象，通过构建启动子替换载体，将 *C. tropicalis* 1798 中甘油激酶 *gk* 基因的启动子更换为 *C lipolytica* 1457 中的 *pGAP* 启动子，高效调控 *gk* 基因的表达，提高 *C. tropicalis* 1798 对甘油的利用效率，降低副产物甘油在酵母中的储存量，同时缓解了热带假丝酵母对于产物的降解消耗，进而提升了长链二元酸的产量。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与引物

热带假丝酵母（*C. tropicalis* 1798）和解脂假丝酵母（*C. lipolytica* 1457）购自购自中国工业微生物菌种保藏中心。含有 G418 抗性基因的质粒 pPIC9k：购自宝生物工程(大连)有限公司；大肠杆菌（*Escherichia coli*）由本实验室保藏。实验所涉及引物见表 1 所示。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer Name	Sequence(5'→3')	Size (bp)	Restriction site
gk-F	GACCACTCTTTTGAGCTCATGCCACGTCGTAGTAGTAA	38	*Sac*I
gk-R	GGTACCGATCCGAGAATTTCGGCAGTTCTAGTATCAGTCC	40	
pGAP-F	TTAGACCACTCTTTTGAGCTCGGTTGAAATGAATCGGCCG	40	*Sac*I
pGAP-R	ACTACGACGTGGCATTGTTGATGTGTGTTTAATTCAAGAATG	42	
Kan^r-F	GACCTTCGTTTGTGCGGATCCTGAGGGAGCCACGGTTGAT	40	*Bam*HI
Kan^r-R	GAAAAGGGGGACGGAGGATCGGTTGAGGCCGTTGAGCAC	40	

1.1.2 培养基

发酵培养基：$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%、酵母浸粉 0.2%、维生素 B_1(vitamin B_1, VB_1)0.02%、NaCl 0.2%、KH_2PO_4 0.8%、Na_2HPO_4•$12H_2O$ 1%、尿素 0.3%、$MgSO_4$•$7H_2O$ 0.6%；葡萄糖 6.2%；油脂；。

LB 培养基：蛋白胨 1%、酵母浸粉 0.5%、氯化钠 1%，pH7.0~7.4

菌体增殖培养基：葡萄糖 2%、蛋白胨 2%、酵母浸粉 1%。

1.1.3 试剂

限制性内切酶 *Bam*HI、*Sac*I、*Avr*II 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、PCR 扩增试剂盒 2×HiFi-PCR Master、2×Taq PCR MasterMix 均购自上海生工生物工程有限公司；高纯度质粒小量快速提取试剂盒由艾德莱生物公司提供;载体 pPICZαA 购自购自杭州宝赛生物科技有限公司；一步法无缝克隆试剂盒 One Step Cloning Kit (ClonEpressII)购自诺唯赞生物科技有限公司。其它试剂均属于国产分析纯。

1.1.4 仪器与设备

ZQZY-CS 恒温振荡培养箱：上海知楚仪器有限公司；Thermoblock PCR 仪：德国 Veriti 公司；DYY-12 型电泳仪：北京市六一仪器厂；MD2000H 核酸超微量系列分光光度计：英国 BioFuture 公司；5804R 型离心机、4308 型电转仪：德国 Eppendorf 公司；7200 可见分光光度计：尤尼柯上海仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 甘油激酶启动子替换载体 pPICzαA-*gkp* 的构建：

使用上海生工 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒分别提取 *C. tropicalis*1798 和 *C. lipolytica* 1457 菌体的 DNA。以 *C. tropicalis* 1798 的 DNA 为模板，使用引物 gk-F、gk-R 进行 PCR 扩增，PCR 扩增条件为：95℃预变性 5 min；94℃变性 30 sec，58℃退火 30 sec，72℃延伸 1.5 min，30 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存，扩增获得长度为 545 bp 的甘油激酶同源臂基因 gkpR；以 *C. lipolytica* 1457 的 DNA 为模板，使用引物 pGAP-F、pGAP-R 进行 PCR 扩增，PCR 扩增条件为：95℃预变性 5 min；94℃变性 30 sec，58℃退火 30 sec，72℃

延伸 2min，30 个循环；72℃延伸 10 min，4℃保存，扩增获得长度为 1000 bp 的启动子基因 *pGAP*；使用艾德莱高纯度质粒小量快速提取试剂盒提取质粒 pPIC9k，以质粒 pPIC9k 为模板，使用引物 Kan^r-F 和 Kan^r-R 进行 PCR 扩增，PCR 扩增条件为：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 3.5 min，30 个循环；72 ℃延伸 10 min，4 ℃保存，30 个循环扩增获得长度为 1358 bp 的 G418 抗性基因片段 *kan^r*；使用 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(上海生工)分别胶回收制得的 *gkpR* 片段、*pGAP* 片段和 *kan^r* 片段。选择酶切位点 *Bam*HI 将质粒 pPICzαA 线性化并作去磷酸化处理，去磷酸化方法按照 Alkaline Phosphatase(Calf intestine)。将 G418 抗性基因片段 *kan^r* 用一步法无缝克隆连接至 pPICzαA 得到重组载体 pPICzαA-*Kan^r*。

连接方法按参照 One Step Cloning Kit(ClonExpressII,Vzayme,China)。选择酶切位点 *Sac*I 将载体 pPICzαA-*Kan^r* 进行线性化并作去磷酸化处理，将基因片段 *gkpR* 无缝连接至线性化载体 pPICzαA-*Kan^r* 得到重组载体 pPICzαA-*Kan^r-gkpR*。选择酶切位点 *Avr*II 将载体 pPICzαA-*Kan^r-gkpR* 线性化并作去磷酸化处理，将启动子 *pGAP* 无缝连接至线性化载体获得重组质粒 pPICzαA-*Kan^r-pGAP-gkpR*（图 1）。

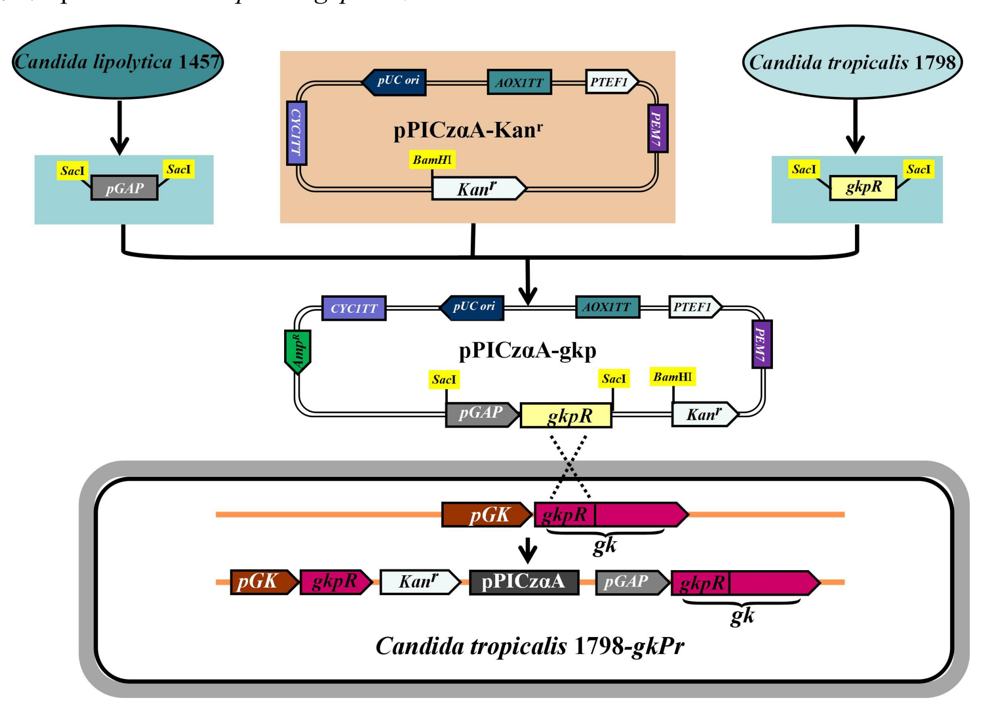


图 1 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 构建流程图

Fig.1 Flowchart of construction of *C. tropicalis* 1798-*gkPr*

1.2.2 重组质粒的浓缩

用高纯度质粒小量快速提取试剂盒（由艾德莱生物公司提供）提取重组质粒 *pPICzαA-gkp*。向提取的质粒中加入 1/10 体积 3mol/L 乙酸钠和 2.5 倍体积无水乙醇，并置于 -20℃冰箱冷却 20min，后经 12000r/min 离心 5min 得到沉淀；加入 300μl 75%乙醇重悬沉淀，12000r/min 离心除去乙醇，37℃风干 30min，最后加入 15~18ul ddH$_2$O 重悬 DNA。使用核酸超微量分光光度计（BioFuture MD2000）测定回收 DNA 浓度，并最终获得浓度为

200~1000ng/μl 的 DNA 溶液。

1.2.3 电转感受态细胞制备

将 *C. tropicalis* 1798 接种到含 50 mL 菌体增殖培养基的 250 mL 三角瓶中，30 ℃、200 r/min，摇床过夜培养；将过夜培养的菌液涂布，得到 *C. tropicalis* 1798 单菌落；用接种环挑取 *C. tropicalis* 1798 单菌落到 50 mL 菌体增殖培养基中，30 ℃、200 r/min，12 h 后转接，培养 10 h；取 1.5 mL 菌液到 EP 管中，3 000 r/min，离心 1 min，收集菌体，用 1.5 mL 预冷的无菌水吹打悬浮细胞；3 000 r/min，离心 1 min，弃上清，用 1 mL 预冷的无菌水悬浮细胞；3 000 r/min，离心 1 min，弃上清，用 1 mL 1 mol/L 预冷的山梨醇悬浮细胞；3 000 r/min，离心 1 min，弃上清，用 80 μL 预冷的山梨醇悬浮细胞，即制成热带假丝酵母电转化感受态；将制备好的感受态细胞于-80 ℃保存，以备后用。

1.2.4 电转化

将浓缩后的重组质粒与 *C. tropicalis* 1798 感受态混合均匀后加入 2 mm 电转杯预冷 5 min，并使用 Eppendorf 电转仪在 1 500 V、5 ms 条件下电击两次，进行电转化[13-14]。电转后立即加入 1 mL 预冷的菌体复苏培养基，混匀，并将其转至灭过菌的 EP 管中，30 ℃低速摇床复苏培养 1 h，离心重悬后涂布含 G418(1 mg/mL)固体 YPD 培养基，30 ℃恒温培养箱中培养 1～2 d，筛选抗 G418 的菌株。

1.2.5 阳性重组菌株的鉴定

挑取上述菌落接种到含 G418 抗性的液体 YPD 培养基中，30 ℃培养过夜后 8 000 r/min 离心收集菌体，使用上海生物工程有限公司提供的试剂盒提取重组菌 DNA，并以获得的基因组为模板，分别以引物 pGAP-F 和 pGAP-R 为引物进行 PCR 扩增，扩增产物利用 1%琼脂糖凝胶电泳进行验证，最终获得阳性重组菌株。

1.3 始菌株和重组菌株的发酵培养与二元酸的测定

取 500 μL 甘油管保藏的 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr*,分别接种于 50 mL 液体 YPD 培养基，30 ℃、200 r/min 培养 12 h。取种子培养液转接于 50 mL 发酵培养基(含葡萄糖)中，接种量为 10%、30 ℃、200 r/min 摇床培养，待生长稳定后调节发酵液 pH 值为 7.5，加入 5%烷烃，进入产酸期。在产酸期，每 12 h 调节 pH 到 7.5b 并取样保存，产酸期 6 d。

取 20 mL 发酵液，加入 2 mL 4 mol/L 的 NaOH 溶液，沸水浴 5 min，混匀，冷却后置于 50 mL 离心管中，10 000 r/min 离心 10 min。吸取中间的水相于 50 mL 锥形瓶中，滴加 3 mol/L 的硫酸溶液至 pH 为 2～3 之间，使二元酸完全结晶析出。抽滤，并用去离子水洗涤锥形瓶和滤饼，至滤液和滤纸呈中性为止。将滤饼及滤纸移入 150 mL 锥形瓶，加入 30 mL 体积分数为 95%乙醇作溶剂，加热使二元酸完全溶解，加入 2～3 滴溴百里香酚蓝作指示剂，用 NaOH 标准液滴定至终点。

1.4 原始菌株和重组菌株培养过程中甘油含量的测定

取 500 μL 甘油管保藏的 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr*,分别接种于 50 mL 含 2%甘油的液体无糖 YPD 培养基，30 ℃、200 r/min 振荡培养，每 2 h 取样检测其 OD_{600} 值。

准确吸取一定量的上清液，放入 50ml 三角瓶中，加入水 10ml，2-3 滴酚酞指示剂；用 0.1mol/L 标准 NaOH 溶液滴定至中性(微红），加入 10ml 0.1mol/L 的高碘酸钠溶液，闭光反

应 5min;再加入 25%乙二醇溶液 5ml，闭光 5min；最后用 0.1mol/L 标准 NaOH 溶液滴定至中性，记录消耗 NaOH 溶液体积 V(mL).。

2. 结果讨论

2.1 甘油激酶启动子替换载体 pPICzαA-*gkp* 的构建

以 *C.tropicalis*1798 的 DNA 为模板，使用引物 gk-F、gk-R 进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测在 500 bp 左右出现特异性电泳条带(图 2a)，与理论长度 545 bp 相符，表明成功获得同源臂 *gkpR*；以 *C. lipolytica* 1457 的 DNA 为模板，使用引物 pGAP-F、pGAP-R 进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测在 1000 bp 左右出现特异性电泳条带(图 2b)，与理论长度 1000 bp 相符，表明成功获得启动子 *pGAP*；以质粒 pPIC9k 为模板，使用引物 Kan^r-F 和 Kan^r-R 进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测在 1300 bp 左右出现特异性电泳条带(图 2c)，与理论长度 1358bp 相符，表明已成功获得 G418 抗性基因片段 kan^r；以提取的质粒为模版，以 gk-F 和 gk-R 进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测在 500bp 左右出现特异性电泳条带(图 2d)，与理论长度 545 bp 相符，表明同源臂基因 *gkpR* 已成功连接至载体；以提取的质粒为模板，以 pGAP-F、pGAP-R 进行 PCR 扩增，1%琼脂糖凝胶电泳检测在 1000bp 左右出现特异性电泳条带(图 2e)，与理论长度 1000 bp 相符，表明启动子替换载体 pPICzαA-*gkp* 构建成功；

2.2 pPICzαA-*gkp* 的电转化及鉴定

使用乙醇沉淀法浓缩获得的重组质粒，使用核酸超微量分光光度计（BioFuture MD2000）测定回收 DNA 浓度，结果显示 DNA 浓度为 453.26 ng/μL。将 10 μL 回收片段与 100 μL *C. tropicalis* 1798 感受态细胞混合并电转化，并使用引物 pGAP-F 和 pGAP-R 对含 G418 平板上生长菌落的基因组进行验证，1%琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物，结果如图 2f 所示，表明 pPICzαA-Kan^r-*pGAP-gkpR* 与 *pgk* 发生同源重组，完成甘油激酶 *gk* 启动子的替换。

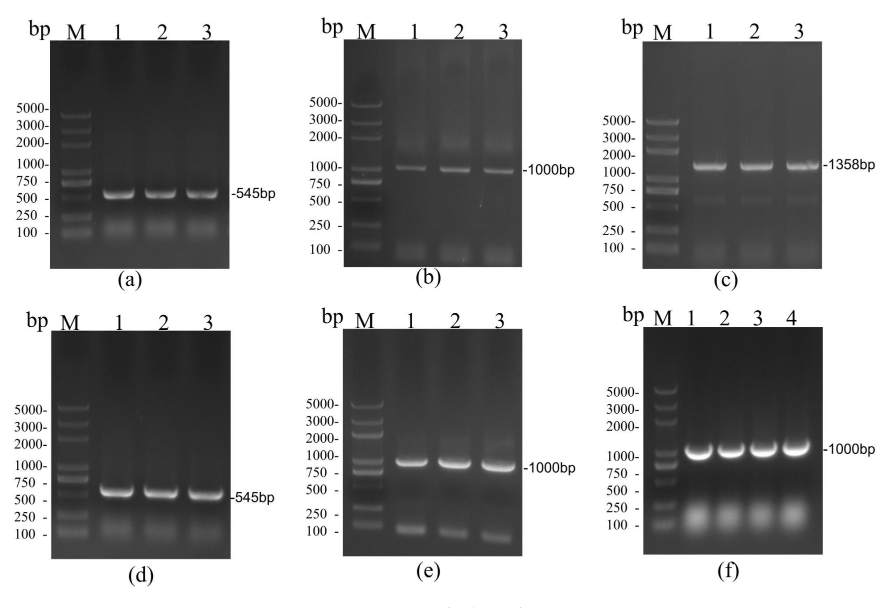


图 2 PCR **产物电泳图**

Fig.2 Electrophoresis of amplified products of PCR

(a)：M: DL5000 Marker; Homologous arm gene *gkpR*, 545 bp. (b)：M: DL5000 Marker; Promoter gene *pGAP*, 1000bp. (c)：M: DL5000 Marker:; G418 resistance gene fragment *kan*^{r}, 1358 bp. (d)： M: DL5000 Marker; Homologous arm *gkpR* was ligated to recombinant vector colony PCR for validation, 545bp. (e)：M: DL5000 Marker; The promoter *pGAP* was ligated to recombinant vector colony PCR for validation, 1000bp. (f)：M: DL5000 Marker; Recombinant strain genome verified by PCR - derived promoter *pGAP*, 1000bp.

2.3 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 生长速率及碳源利用分析

将 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 接种于 50 mL 发酵液体培养基，接种量为 2% ，30 ℃、200 r/min 的条件下培养，每个菌做 3 个平行，每隔 2 h 取样并检测其 OD_{600} 值绘制生长曲线。

由图 3 可知，以葡萄糖为唯一碳源时，两个菌的生长速度基本一致，10 h 后生长均进入稳定期(见图 3a)，表明启动子基因 *pGAP* 的替换对葡萄糖的代谢影响不大；以甘油为唯一碳源时， *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 的生长速率明显高于 *C. tropicalis* 1798， 14h 时 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 的 OD_{600} 达到最大 10.98，比 *C. tropicalis* 1798 最大 OD_{600} 高 3.35。14 h 后由于营养物质的缺乏导致菌体自溶，OD_{600} 值下降，进入衰退期(见图 3b)。*C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 对培养基中葡萄糖的消耗情况基本一致(见图 3c),表明启动子基因 *pGAP* 的替换对葡萄糖的代谢影响不大；以甘油为唯一碳源培养 20h， *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 对培养基中甘油的消耗量达到 81.5%，比 *C. tropicalis* 1798 高 14.5%(见图 3d)。表明启动子 *pGAP* 的替换显著的提高了热带假丝酵母对甘油的利用效率。

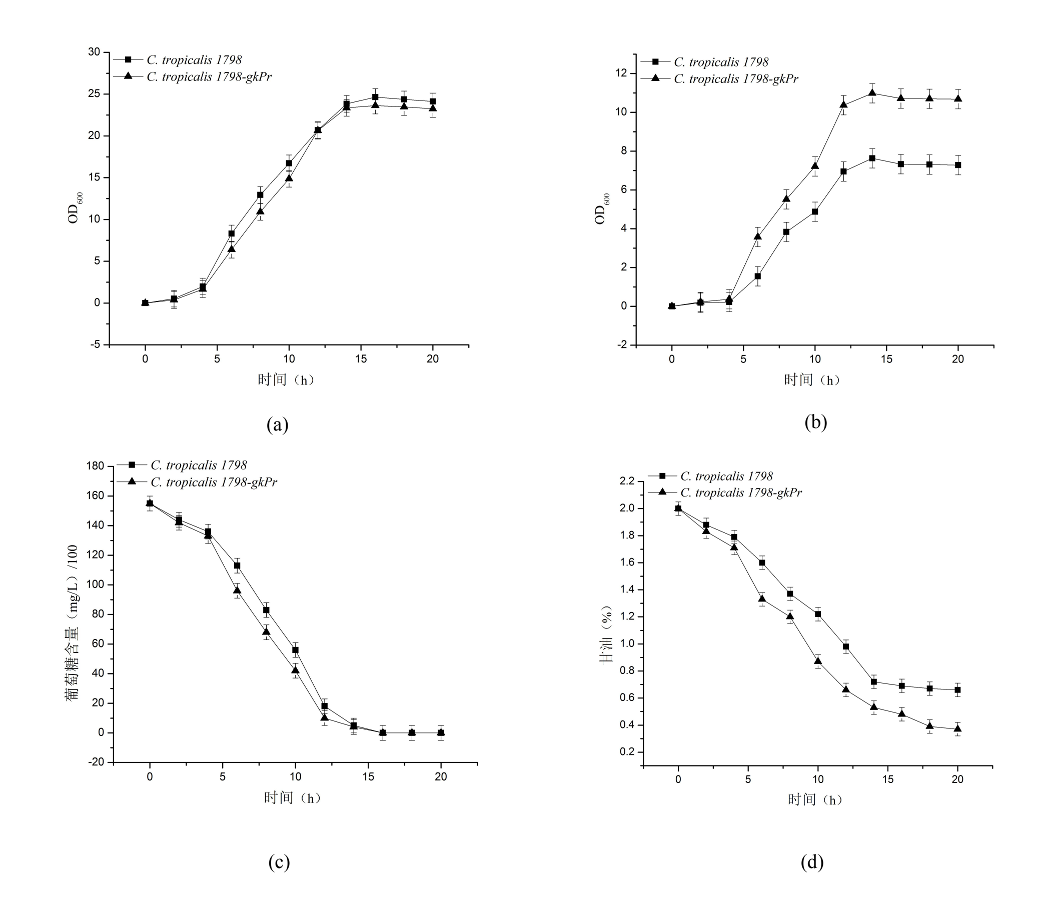


图 3 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 生长曲线及碳源利用分析

Fig.3 Culture curve and carbon source utilization of *C. tropicalis* 1798 and *C. tropicalis* 1798-*gkPr*

(a): The growth curve of C. tropicalis 1798 and C. tropicalis 1798-gkPr when glucose is the sole carbon source.(b): The growth curve of C. tropicalis 1798 and C. tropicalis 1798-gkPr when glycerol is the sole carbon source.(c): The consumption of glucose in the culture medium of C. tropicalis 1798 and C. tropicalis 1798-gkPr.(d): The consumption of glycerol at C. tropicalis 1798 and C. tropicalis 1798-gkPr when glycerol was the sole carbon source.

2.4 以油脂为底物 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 的发酵验证

菌体生长进入稳定期后加入 5%油脂，每 12 h 调节 pH 到 7.5，产酸期 6 d。用标准氢氧化钠溶液滴定，测得二元酸的质量浓度，结果表明，*C. tropicalis* 1798-*gkPr* 比 *C. tropicalis* 1798 产二元酸的量明显提升，其产量为 5.48g/L，较 *C. tropicalis* 1798 产长链二元酸的量提升了 32.7%。（见图 4）

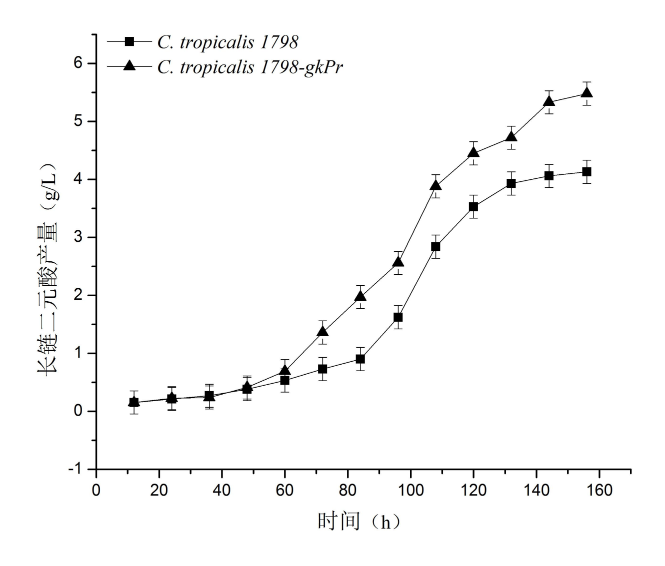


图 4 *C. tropicalis* 1798 和 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 发酵油脂曲线

Fig.4 Fermentation curve of grease by *C. tropicalis* 1798 and *C. tropicalis* 1798-*gkPr*

3.结论

启动子是基因表达调控的顺式元件，也是基因工程表达载体的一个重要元件，启动子在转录水平上的重要作用，不仅决定了基因的表达水平，也决定了基因表达的时空顺序[15-17]。*pGAP* 是一种组成型强启动子，当与表达载体一起整合到酵母基因组中，可以随基因组一起复制和遗传，避免了外源基因的丢失现象[18]。

本实验利用 PCR 扩增技术获取热带假丝酵母 *gk* 基因同源臂 *gkp*、解脂假丝酵母中启动子基因 *pGAP*，抗性标签 G418 基因 kan^r。借助一步法无缝克隆技术构建热带假丝酵母 *pGAP* 基因替换载体(pPICzαA-*gkp*)。借鉴酵母菌中目的基因敲除常用双交换同源重组的方法[19-20]，即采用以质粒为载体的同源双交换，获取目的基因上下游两段基因序列作为同源臂，构建穿梭载体或自杀载体并转化到目的菌株中，转化后需先后发生两次单交换，实现目的基因的敲除的方法[21]，来实现启动子基因的替换；构建的更换载体包含三段序列即同源臂和目的基因、抗生素抗性标签基因，构建流程简单，基因更换周期短，有效降低实验成本，提高工作效率。

对启动子 *pGAP* 基因替换的菌株经过发酵研究发现：在以葡萄糖为唯一碳源时对细胞的生长影响较小。在以甘油为唯一碳源时重组菌株 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 生长速度明显快于原始菌株 *C. tropicalis* 1798，并且重组菌株对培养基中甘油的消耗量明显高于原始菌株。以油脂为底物发酵时重组菌株 *C. tropicalis* 1798-*gkPr* 比原始菌株 *C. tropicalis* 1798 产长链二元酸的量升高，其产量为 5.48g/L，比 *C. tropicalis* 1798 产二元酸提高了 32.7%；因此表明 *C. tropicalis* 1798 中甘油激酶的启动子 *pgk* 在被更换成 *pGAP* 后，提高了 *C. tropicalis* 1798 对于油脂组分中甘油成分的利用效率，此外研究还发现，甘油利用效率提高的同时也缓解了热带假丝酵母对于产物的降解消耗，进而提升了长链二元酸的产量。

参考文献

[1] A dedayo M.R, Ajiboye E.A, Akintunde J.K, and Odaibo A. Single cell proteins :As nutritional enhancer, Advances in Applied Science Research[J].,2011, 2(5): 396-409

[2] Liu JD, Fu C, and Wang TY, Application of Candida tropicallis in the treatment of cassava-starch-alcohol waste water, China Brewing, 2009, 208(7): 121-123

刘继东，付灿，王同阳，热带假丝酵母在木薯淀粉酒精废液治理中的应用研究[J]. 中国酿造，2009，208（7）：121-123

[3] Gao YR, Li DP, and Liu Y, Production of single cell protein from soy molasses using using Candida tropicalis, Ann Microbiol[J], 2011, 62(3): 1165-1172.

[4] Liu ZT. Study on long-chain dicarboxylic acid fermentation[J]. Microbiology Bulletin, 1979, 19（1）: 71-75.

刘祖同. 长链二元酸发酵的研究[J]. **微生物学通报**, 1979, 19（1）:71-75.

[5] Gui QF, Yao JM, Jiang YS. et al. Advances in production of long-chain dicarboxylic acid by fermentation of tropical candida[J].Chemistry&Bioengineering, 2014, 31(1): 17-22.

桂秋芬，姚嘉旻，蒋洋松，等. 利用热带假丝酵母发酵生产长链二元酸的研究进展[J]. **化学与生物工程**, 2014, 31(1): 17-22.

[6] Blandin G, Ozier-Kalogeropoulos O, Wincker P, et al. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 16. *Candida tropicalis*.[J]. **FEBS Letters**, 2000, 487(1): 91-94.

[7] Zhu GJ, Wang ZX. Study on key enzymes of glycerol metabolism of candida glycerol[J]. Acta

Microbiological Sinica, 1999, 39(1): 91-93.

诸葛健, 王正祥. 产甘油假丝酵母甘油代谢关键酶的研究[J].**微生物学报**, 1999, 39(1): 91-93.

[8] Gerhard M. Biochemical Pathways. 3nd ed.Germany: BoehringerMannheim Press, 1996.

[9] Guo XN, Zhu Ge B, Zhu Ge J. Research Progress on The Glycerol Kinase[J]. Acta Microbiological Sinica. 2002, 42(4): 510-513.

郭雪娜, 诸葛斌, 诸葛健. 甘油代谢中甘油激酶的研究进展[J]. **微生物学报**, 2002, 42(4): 510-513.

[10] Wang ZX, Zhuge J, Fang HY, et al. Glycerin Porduction by fermentation: Aerview[J]. **Biotechnol Advanees**, 2001, 19: 201-223.

[11] Wang ZX, Zhuge J, Fang HY, et al. A new breviscapus of candida glycerin with high osmotic pressure and high yield glycerol[J]. Acta Microbiological Sinica. 1999, 39(l): 68-74.

王正祥, 诸葛健, 方慧英. 耐高渗压高产甘油的假丝酵母新种一产甘油假丝酵母[J]. **微生物学报**, 1999, 39(l): 68-74.

[12] Shen W, Wang ZX, Rao ZM, et al. A genetic transformationsystem based on trp1 complementation in *Candida glycerinogenes*[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011, 27(4): 1005-1008.

[13] F. M. Osbo, R. E. Kingston, et al. A guide to molecular biology experiment[M].Beijing:Science Press, 1998.

F. M. 奥斯博, R. E. 金士顿, 等. **精编分子生物学实验指南**[M]. 北京: 科学出版社, 1998.

[14] Xing ZQ, Wang YN, Liu ZX, et a. Cloning of *Lactobacillus kefiranofaciens* β-galactosidase and expression in Pichia pastoris[J]. China Brewing, 2016, 35(1): 10-13.

邢竹青, 王彦宁, 刘兆贤, 等. *Lactobacillus kefiranofaciens* 乳糖酶基因克隆及在毕赤酵母中表达[J]. **中国酿造,** 2016, 35(1): 10-13.

[15] Wolff A M, Arnaul J. Cloning of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding genes in *Mucor circinelloides* (Syn.racemosus) and use of the gpdl promoter for pecombinant protein production[J]. **Fungal Genetics and Biology**, 2002, 35(1): 21-29.

[16] Schmitt EK, Kempken R, Kuck U. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC[J]. **Mol Genet Genomics**, 2001, 265(3): 508-510.

[17] Liu GM, Zhao Z, Zhang YZ, et al. Cloning and analysis of promoter fragment of corynebacterium glutamicum 10147 genome[J]. Acta Microbiological Sinica. 2009, 49(7): 972-977.

刘桂明, 赵智, 张英姿, 等. 谷氨酸棒杆菌 10147 基因组中启动子活性片段的克隆与分析[J]. **微生物学报**, 2009, 49(7): 972-977.

[18] Gong HW, Hou HY, Wang PW, Zhang JF. Research progress of pGAP-pichia pastoris expression system[J]. Food Engineering Technology, 2011, 29(1): 159-161.

耿宏伟, 侯红燕, 王丕武, 张建峰. pGAP-毕赤酵母表达系统的研究进展[J]. **食品工程技术**, 2011, 29(1): 159-161.

[19] Xu Y, Tu Z. Application and progress of filamentous fungi gene targeting[J]. **J Food Sci Biotechnol**, 2007, 26(1): 120-126.

[20] Xiang Z, Chen XZ, Zhang LH, et al. Development of a genetic transformation system for *Candida tropicalis* based on a reusable selection marker of URA3 gene[J]. **Hereditas (Beijing)**, 2014, 36(10): 1053-1061.

[21] Xue KJ, Liu B, Chang SH, et al. A high efficient method to knockout target gene by two-step homologous recombination in Pichia pastoris. Lett Biotechnol, 2010, 21(5): 650－654